

RS ウイルスの分離培養に関する検討

八島 加八 則常 浩太 藤井 慶樹 山本 美和子
松室 信宏 石村 勝之

はじめに

RS ウイルス (Human respiratory syncytial virus (RSV)) は、パラミクソウイルス科、ニューモウイルス属に属するウイルスで、1 本鎖マイナス鎖のエンベロープを有する RNA ウイルスである。ウイルスの名前は、感染細胞に生じる形態学的変化である合胞体 (syncytium) に由来する。血清型は大きくふたつの亜型 (A, B) に分けられ、ウイルス流行時には 2 種類の亜型が同時に確認されることが多い。RSV は乳幼児及び小児の重要なウイルス呼吸器感染症の原因ウイルスであり、臨床症状は発熱性の上気道炎を主徴とするが、一部の罹患児では細気管支炎や肺炎などを引き起こす¹⁾。

当所では RSV のウイルス分離及び遺伝子検査を行っており、ウイルスの亜型 (A, B) を分類することも可能である。本来、ウイルス分離で RSV が分離されるのが望ましいが、分離培養のためには検体の採取時期や保存状態を含めて適切な条件が整う必要がある。RSV は凍結解凍時にウイルスの感染力が低下するため、分離までの期間が短い場合は 4℃ 保冷が望ましい²⁾。当所ではウイルス分離を行うとともに、検体から直接遺伝子検査として Real-Time PCR 法による RSV の同定も行っている。今回、ウイルスの感染力が低下すると考えられる凍結解凍後に、RSV の分離培養が可能か検討したので報告する。

方法

1 材料

2015/2016年シーズンにおいて、広島市感染症発生動向調査事業の定点医療機関を受診し、呼吸器症状を呈した患者から採取した鼻汁74検体を検査材料として用いた。

2 遺伝子検査

前処理を行った患者の鼻汁又は分離培養したウイルスの細胞培養上清140µLを用い、QIAamp Viral RNA Mini KitでRNAを抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit及びオリゴdTプライマーを使用してcDNAを合成した。その後、TaqMan Fast Advanced Master Mixを使用してReal-Time PCR法によりRSVを検出し、Ct値を求めた。

3 ウイルス分離

Real-Time PCR法によりRSVが検出され、コピー数が多いと思われるCt値が25未満であった鼻汁検体をウイルス分離培養検体とし、-80℃で凍結保存されたものを解凍して用いた。培養細胞は国立感染症研究所のRSウイルス検査マニュアル²⁾に従い、RSV感受性細胞として使用されているHEp-2細胞(ヒト喉頭癌細胞由来株化)を用いた。細胞の維持培地は、2%牛胎児血清添加MEM培地を使用し、細胞変性効果 (Cytopathogenic effect : 以下CPE) を指標として、34℃炭酸ガス5%下で2週間培養し、更にCPEが確認されるまで継代を3回まで繰り返した。その結果、CPEが確認されなかった場合はウイルス分離陰性とした。また、CPEが確認された場合は培養液を回収、RNA抽出後にReal-Time PCR法によりRSVが検出された上で、Ct値の減少を確認した。

結果

2015/2016年シーズンにおける Real-Time PCR 法により RSV が検出された鼻汁検体は 74 検体中 26 検体であり、そのうち Ct 値が 25 未満であったものは 12 検体であった。その検体情報を表 1 に示す。12 例中 11 例が 0 歳児であり、男女で特徴的な差は認められなかったが、採取日はインフルエンザが流行する前の 11 月と 12 月に集中していた。また、12 例中 5 例で RSV 感染の中心的病像である細気管支炎と診断されていた。

遺伝子検査の結果、Ct 値が 25 未満であった RSV の亜型は、表 2 に示すように、B 亜型の 1 例を除き、その他すべてが A 亜型であった。

ウイルス分離培養の結果、12 検体のうち CPE が認められたのは、Ct 値が 19.5 の 1 検体のみであり、CPE が起きた HEp-2 細胞には、図 2 に示すように合胞体の形成が確認された。その他の検体については、継代を 3 回繰り返しても CPE が認められなかった。また、CPE が認められた 1 検体については、Real-Time PCR 法により RSV が同定された。更に、培養後の Ct 値が培養前の 19.5 から 17.5 へと減少した。

表 1 検体情報

年齢	性別	診断名	検体採取日
0	女	不詳(上気道炎)	2015/9/7
7	女	喘息, 気管支炎	2015/11/18
0	男	RSV 感染症	2015/11/25
0	男	RS 細気管支炎	2015/11/26
0	女	細気管支炎	2015/11/30
0	女	RS ウイルス感染症	2015/12/5
0	男	RS 細気管支炎	2015/12/8
0	不詳	RS ウイルス感染症	2015/12/13
0	女	RS ウイルス感染症	2015/12/14
0	男	RS ウイルス感染症	2015/12/14
0	男	細気管支炎	2016/1/10
0	男	RSV 細気管支炎	2016/2/15

表 2 RSV の亜型と Ct 値及び分離結果

亜型	Ct 値	CPE	培養後 Ct 値	分離培養
A	21.8	-	-	陰性
A	22.2	-	-	陰性
B	24.1	-	-	陰性
A	22.4	-	-	陰性
A	21.7	-	-	陰性
A	23.7	-	-	陰性
A	22.6	-	-	陰性
A	23.4	-	-	陰性
A	24.1	-	-	陰性
A	22.9	-	-	陰性
A	22.5	-	-	陰性
A	19.5	+++	17.5	陽性

考 察

今回、遺伝子検査の結果でコピー数が多いと思われる検体は、感染性のあるウイルスが残存している可能性も高いであろうと仮定した。そして、検体に RSV が分離されやすいとされる³⁾鼻汁を使用することにより、一度凍結解凍した後でも RSV を分離培養することが可能かどうかについて検討した。しかし、分離培養が陽性であったのは 1 検体のみであった。RSV は感染力が非常に強い¹⁾が、一度凍結し解凍してしまうとウイルスの感染力が低下する可能性があるため、検体を凍結する前に細胞に接種するのが理想である。しかし、凍結解凍した後でもウイルスのコピー数が多ければ、分離が可能になるのではないかとこの仮説のもとで



図 1 正常 HEp-2 細胞

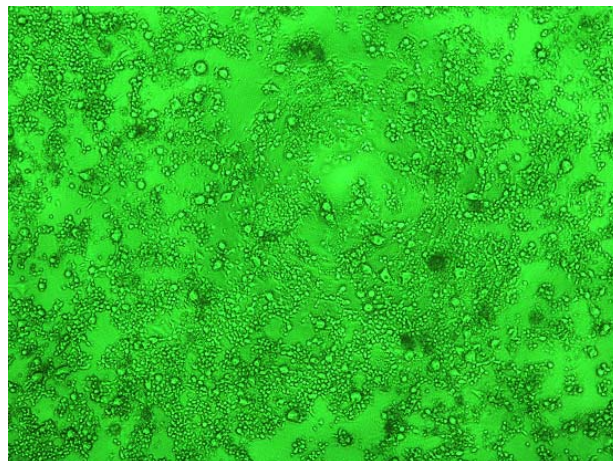


図 2 合胞体を形成した HEp-2 細胞

の試みであったが、期待された結果は得られなかった。今回分離培養できた 1 検体は 12 検体中 Ct 値が最も低いものであり、コピー数は最も多かったものと推察される。しかし、この 1 検体だけの結果からコピー数の多い検体が必ずしも感染性が高いとは言いきれない。今回は、凍結解凍せずに培養した場合との比較は行っていないが、もし、コピー数と感染性との間に必ずしも関連性はないとしたら、やはり一度凍結解凍してしまうと、RSV を分離するのは困難なのかもしれない。更に、検体によっては採取後日にちが経ってから搬送されているものもあり、RSV を分離するには不利な条件が重なったことも原因のひとつとして考えられる。また、亜型については 12 検体中 11 検体が A 亜型であったため、亜型による差があったのかどうかを比較検討することはできなかった。

今回分離培養できた検体では、合胞体と呼ばれる RSV の名前由来にもなっている特徴的な細胞

変性が確認できた(図2)。図1に示すHEp-2の正常細胞と比較してもその違いは明らかであった。これについては、CPEが確認されると早い段階で合胞体が出現したため、分離培養ができれば途中でRSVであることを推測しやすいと思われる。

RSVの分離に関しては、他の地方衛生研究所でも分離できているところとできていないところがあり⁴⁾⁻⁶⁾、一概に分離が不可能だとは言いきれないが、やはりRSVを分離するためには、定点医療機関に採取後できるだけ早い検体の送付を依頼し、検体到着後すぐに細胞に接種する等、分離に適切な条件を整えることが重要であると思われる。

謝 辞

広島市感染症発生動向調査事業にご協力頂きました定点医療機関各位に深謝致します。

文 献

- 1) 堤 裕幸：RS ウイルス感染症，感染症誌，79，857～863(2005)
- 2) 国立感染症研究所：RS ウイルス検査マニュアル
- 3) 鈴木 宏：RS ウイルス その他，臨床とウイルス，23，220～224(1995)
- 4) 長谷川道弥 他：呼吸器感染症における起因ウイルスの検出状況について，東京衛研年報，52，18～21(2001)
- 5) 木上照子 他：京都府における呼吸器感染症を中心としたヒトメタニューモウイルス，RSウイルスの検出，京都府保環研年報，56，7～12(2011)
- 6) 和田美江子 他：呼吸器ウイルス感染症患者検体からのウイルス検出状況，島根保環研所報，55，39～42(2013)